

# 複合脂質に関する生化学的研究

## 第16報 コリン磷脂質定量法に関する検討

大野 公 吉

札幌医科大学学生化学教室 (主任 大野教授)

### Biochemical Studies on Compound Lipids

#### XVI. On the Quantitative Method of the Choline-Phospholipids

By

KIMIYOSHI OHNO

Department of Biochemistry, Sapporo University of Medicine

(Chief: Prof. K. OHNO)

磷脂質中のコリンの測定には、先ず酸或はアルカリによる磷脂質の水解、次に水解液中のコリン測定 of 2 段階に分けられる。

コリン定量法としては Enantio-Jodide 法及び Reineckate 法<sup>1)</sup> が従来一般に使用されている。又水解法としては従来 HCl-メタノール法<sup>2)</sup>, NaOH-アルコール法<sup>3)</sup> 及び Ba(OH)<sub>2</sub>-アルコール法<sup>4)</sup> が一般に使用されている。著者は磷脂質中のコリンの測定に際してのこれらの3法を Reineckate 法を用いて比較検討を試みた。

#### 実験方法並びに成績

コリン定量の Reineckate 法としては Beattie の比色法, Thunhauser 等の光電比色法及び Ramsay & Stewart<sup>6)</sup> の N 測定法があるが、著者は比色法並びに窒素測定法を採用した。

水解剤としては 6N-HCl メタノール, 1N-NaOH アルコール及び飽和 Ba(OH)<sub>2</sub> アルコールの3者を使用した。

先ずコリン 1.23 mg をそれぞれ上記3水解剤とともに沸騰水浴上にて還流し、3水解法におけるコリンの安定性を比較した結果は第1表の如くである。Ba(OH)<sub>2</sub> 法及び HCl-メタノール法では4或は6時間加熱により変化がないが、

NaOH-アルコール法では1時間では著明な変化はないが、2ないし4時間では最高50%に及ぶコリンの消失が認められた。

磷脂質として次の3製品を使用した。

1) 家兎肝臓より抽出精製せる磷脂質、その約85%がグリセリン磷脂質である。

2) 大豆磷脂質 (武田製のいわゆる Lecithin)。

3) 牛脳髓プロダゴンよりピリヂン、氷醋酸処理により可及的に糖脂質及び硫脂質を除去せる Sphingomyelin 製品。

これらの3製品を用いて3水解法を比較した結果は第2表の如くである。

製品1)及び2)では3方法何れも満足すべき結果を与えるが、製品3)は NaOH アルコール法のみが満足すべき結果を得た。

第1表 種々なる水解法におけるコリンの安定性について (添加コリン量 1.23 mg)

加熱時間	HCl-メタノール (mg)	NaOH アルコール (mg)	Ba(OH) <sub>2</sub> アルコール (mg)
0	1.220, 1.231	—	1.220
1	—	1.210, 1.102	1.209
2	—	1.008, 0.921	1.209
4	1.230, 1.227	0.821, 0.567	1.218
6	1.210	—	—

1) Beattie, F. J. R.: Biochem. J. 30, 1554 (1936).

2) Thunhauser, Benotti & Reinstein: J. Biol. Chem. 129, 709 (1939).

3) Brante: Biochem. Z. 305, 144 (1940).

4) Williams, Erickson, Arvin, Bernstein & Macy: J.

Biol. Chem. 123, 111 (1938).

5) Erickson, Arvin, Teague & Williams: J. Biol. Chem. 135, 677 (1940).

6) Pamsay & Stewart: Biochem. J. 35, 39 (1941).

第 2 表 各種磷脂質製品の各種水解法によるコリン測定と比較

磷脂質製品	水 解 剤	加熱時間	コ リ ン 量 (mg)			%
(I) (5.014 mg)	HCl-メタノール	1	0.097,	0.074		20.2
		2	0.331,	0.269		71.4
		3	0.398,	0.423,	0.412	97.8
		4	0.425,	0.421,	0.423	100.7
		5	0.423,	0.422,	0.420	100.2
		6	0.418,	0.420,	0.423	100.
	NaOH-アルコール	0.5	0.315,	0.406		85.7
		1	0.423,	0.401,	0.424	99.5
		2	0.406,	0.387		94.5
		3	0.340,	0.289		75.0
		4	0.287,	0.139		48.3
		5	0.129,	0.100		27.4
	HCl-メタノール	4	0.188,	0.190,	0.188	100.
		2	0.187,	0.189		100.
	Ba(OH) <sub>2</sub>	2	0.187,	0.189		100.
		2	0.187,	0.189		100.
(II)	HCl-メタノール	4	0.188,	0.190,	0.188	100.
(III) (4.25 mg)	HCl-メタノール	4	0.188,	0.154		28.0
		6	0.172			28.0
	NaOH-アルコール	1	0.542,	0.655		97.4
		2	0.616,	0.614		100.

第 3 表 各種磷脂質製品混合に際しての各種水解法におけるコリン測定と比較

磷脂質製品	コ リ ン 含 量 (計 算 値)	水 解 剤	時 間	コ リ ン 値 (実 測 値)	実測値 計算値 × 100
(I)+(III)	0.212mg (I)	HCl-メタノール	4	0.534	99.1
	0.327mg (III)		〃	0.540	100.2
	0.539mg		〃	0.537	99.6
		NaOH-アルコール	6	0.538	99.8
			1	0.535	99.2
			〃	0.494	91.7
			2	0.463	85.9
		HCl-メタノール	5	0.430	99.1
			〃	0.406	93.5
			〃	0.321	74.0
(II)+(III)	0.189mg (II)	HCl-メタノール	4	0.311	71.7
	0.295mg (III)		5	0.581	98.4
	0.484mg	Ba(OH) <sub>2</sub>	2	0.579	98.1
			〃	0.577	98.0
		Ba(OH) <sub>2</sub>	2	0.577	98.0
			〃	0.582	98.6
(II)+(III)	0.467mg (II)	HCl-メタノール	4	0.311	71.7
	0.123mg (III)		5	0.581	98.4
	0.590mg	Ba(OH) <sub>2</sub>	2	0.577	98.0
			〃	0.582	98.6
			4	0.579	98.1
			〃	0.569	96.3

果を与え、HCl-メタノール法はその 30% にすぎず、 $\text{Ba}(\text{OH})_2$  法ではコリンの測定が不可能であつた。

〔註〕 NaOH 法の結果はこの sphingomyelin 中にコリンが 14% 有含されていることを示す。磷脂質が 4% の P を含有するとせば、分子量は 775 となり、コリン塩酸塩、分子量 139.6 の理論値は 18.01% となる。

次に 3 製品を混合して 3 水解法を比較した結果は第 3 表の如くである。製品 1) 或は 2) に比して製品 3) をやや過利に加えた場合には、HCl-メタノール法は NaOH 法に匹敵する数値を示したが、 $\text{Ba}(\text{OH})_2$  法はなお不充分であつた。製品 2) に比して製品 3) を極少量加えた場合には  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  法もまた満足すべき結果を与えた。

## 結 論

1) 肝磷脂質及び大豆磷脂質中のコリンの測定には HCl-メタノール法、NaOH アルコール法、及び  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  アルコール法、何れも満足すべき結果を与える。

2) Sphingomyelin 中のコリン測定には NaOH 法のみが使用し得る。

3) Sphingomyelin に適当量の肝磷脂質或は大豆磷脂質を加えれば HCl-メタノール法並びに  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  法ともに NaOH 法に匹敵する優秀な結果が得られる。

(昭和 30. 2. 17 受付)

## Summary

Three hydrolysis-methods of Phospholipids, namely HCl-methanol, NaOH-alcohol and  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -alcohol method were compared as choline determination methods.

While a reasonable amount of choline was found using the above 3 methods in liver and soybean phospholipids, which are composed mainly of glycerophospholipids, it was found that NaOH-alcohol method alone can be successfully utilized to determine the amount of choline in Sphingomyelin.

It was noted however that an addition of appropriate amounts of glycerophospholipids to the sphingomyelin preparations, rendered the determination of choline in sphingomyelin by HCl-method and  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  alcohol method equal to NaOH-method.

(Received Feb. 17, 1955)